

CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE CEPAS DE VIRUS RÁBICO AISLADAS DE DIFERENTES REGIONES EN VENEZUELA. PERIODO 2001-2004

Antigenic Characterization of Rabies Virus Strains Isolated from Different Regions in Venezuela. 2001-2004 Period

Mayra A. Hidalgo^{*,1}, Sara M. Papo^{*}, Noris E. Plaza^{*}, Fautino E. Moreno^{*}

**Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) - Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Apartado 70. Maracay 2101, Estado Aragua, Venezuela*

Correo-E: mhidalgo@inia.gob.ve

Recibido: 09/05/05 - Aprobado: 27/04/06

RESUMEN

A objeto de conocer la situación epidemiológica de las variantes antigénicas del virus rábico en Venezuela, se analizaron 45 cepas, aisladas durante el período 2001-2004. Estas fueron amplificadas en cerebro de ratones lactantes y la caracterización antigénica se realizó por inmunofluorescencia indirecta de improntas de los cerebros de esos animales, utilizando un panel de 8 anticuerpos monoclonales dirigidos contra la nucleocápside viral. De las muestras analizadas, 37 fueron aisladas de bovinos, 1 de canino, 1 de gato, 4 de equinos y 2 de ovinos, con una distribución en diversas regiones del país. Las cepas fueron ubicadas como variante antigénica 3 (*Desmodus rotundus*), sugiriendo que estos quiropteros hematófagos se ubicaron como la principal especie transmisora del virus rábico, para los animales domésticos, durante el periodo estudiado. Esta variante también fue aislada en un perro y un gato de zonas urbanas libres de rabia canina, lo que sugiere que el quiróptero invadió en ese momento, un nicho que no correspondía a su hábitat natural, transmitiendo el virus a las mascotas. Esta investigación es la segunda efectuada en Venezuela en 10 años. La variante circulante es mantenida en un ciclo cuyo principal reservorio es *D. rotundus*. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de la presencia de otras variantes, en cuyo ciclo estén involucradas diferentes especies de mamíferos salvajes como vectores transmisores.

(Palabras clave: Animales domésticos, rabia, chiroptera, inmunofluorescencia, antígeno, vigilancia de enfermedades, Aragua)

ABSTRACT

Forty-five rabies strains from domestic animals, collected in Venezuela between 2001 and 2004, were characterized by using eight anti-nucleoprotein monoclonal antibodies. Of all strains analyzed, 37 were isolated from bovines, 1 from canine, 1 from cat, 4 from equines and 2 from ovines, distributed on diverse regions of the country. Antigenic characterization demonstrated that all strains were identified as variant 3 associated with *Desmodus rotundus* bats, suggesting that vampire bats were the principal transmissible species of rabies virus to domestic animals during the studied period. This variant was isolated in a dog and a cat of urban areas free of canine rabies, indicating that vampire bats invaded in that moment, a niche that would not belong to their natural environment, transmitting rabies virus to pets. This is the second epidemiological research within the last ten years carried out in Venezuela to demonstrate the variants of rabies virus which are circulating in the country.

(Key words: Domestic animals, rabies, chiroptera, immunofluorescence, antigens, disease surveillance, Aragua)

INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad mortal, que afecta el sistema nervioso central de una gran cantidad de mamíferos de todas las edades y es producida por el virus de la rabia, perteneciente al género *Lyssavirus* de la familia *Rhabdoviridae* (De Mattos *et al.*, 2001). En la naturaleza, ocurre en dos ciclos epidemiológicos diferentes: la rabia urbana, en la cual el perro es el principal reservorio y transmisor y la rabia silvestre, que se presenta en diferentes especies de animales salvajes, los cuales actúan como reservorios y transmisores de la enfermedad (Acha y Szyfres, 1989). La rabia, en sus dos ciclos, es endémica en la mayoría de los países de Latinoamérica (Organización Panamericana de la Salud, 2001). Debido al carácter zoonótico de esta enfermedad y a las pérdidas económicas que ocasiona en la ganadería, se hace necesario mantener una vigilancia epidemiológica activa a objeto de controlar la aparición de brotes de rabia en los animales y/o de casos en la población humana.

La caracterización antigénica del virus rábico mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra determinantes antigénicos de la nucleocápside viral (Reid-Saden *et al.*, 1990), permite ubicar la distribución geográfica y temporal de las cepas virales, además de determinar la interrelación que se establece entre las especies que actúan como reservorio o transmisores de la enfermedad en la naturaleza (Smith, 1989; Bracamonte y Plaza, 2000; Johnson *et al.*, 2004). Este conocimiento es determinante en las actividades de vigilancia, prevención y control de la enfermedad, orientando entre otras acciones, los planes de vacunación del ganado y las mascotas, así como las jornadas de captura, clasificación y control de las poblaciones de murciélagos hematófagos. Con esta técnica, se han definido para las Américas

11 variantes antigénicas (de Mattos y de Mattos, 1989), cuyas especies reservorios incluyen mamíferos domésticos y salvajes y con las que se puede definir si el ciclo epidemiológico de la enfermedad es silvestre o urbano, dependiendo de la variante aislada. En Sudamérica, se han detectado hasta ahora las variantes 1 (canino), 2 (canino), 3 (murciélago hematófago), 4 (canino), 5 (vampiro Venezuela) y 6 (*Lasirus cinereus*, murciélago no hematófago) (Yung *et al.*, 2002; Cisterna *et al.*, 2005).

En Venezuela, desde hace varios años, la rabia canina se encuentra ubicada exclusivamente en las zonas urbanas de varios municipios del estado Zulia, mientras que la rabia en bovinos y otras especies domésticas (equinos, ovinos) se presenta distribuida en diversas regiones del país (Ministerio de Salud y Desarrollo Social, 2004).

La detección de casos aislados en un canino y un gato, en zonas urbanas con largos períodos de silencio epidemiológico, evidenció la necesidad de realizar la caracterización antigénica de cepas de virus rábico aisladas de diferentes regiones de Venezuela, durante los años 2001-2004, a fin de conocer la situación epidemiológica de las variantes antigénicas de este virus en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

El estudio se realizó con 45 cepas de virus rábico aisladas en el Laboratorio de Rabia de Sanidad Animal-Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP)-Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA), Maracay, Venezuela, entre los años 2001-2004. En ese período se evaluaron 1.341 muestras de tejido nervioso de diversas especies animales, entre las cuales se incluyen 103 murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) y 244 no hematófagos. Las 45 cepas virales objeto del estudio, fueron aisladas de diferentes especies animales (37 bovinos, 4 equinos, 2 ovinos, 1 canino y 1 gato) y se ubicaron en diversas entidades federales del país, como se muestra en la Figura 1 y Tabla 1.

A fin de amplificar las cepas, estas se inocularon en ratones albinos cepa NIH (National Institute of Health, USA) de tres días de edad, por vía intracraneal (Meslin *et al.* 1996), los cuales se observaron diariamente hasta la aparición de signos nerviosos, recolectándose sus cerebros.

Caracterización antigénica por inmunofluorescencia indirecta (IFI), con anticuerpos monoclonales (AcM)

Se hicieron improntas de los cerebros de los ratones recolectados, se tiñeron por IFI con un panel de ocho AcM dirigidos contra la nucleocápside viral, en dilución 1:100, siguiendo un protocolo previamente descrito (de Mattos y de Mattos, 1989).

Luego de un periodo de incubación de 30 minutos a 37°C, las láminas se lavaron a fin de remover los AcM libres y se tiñeron, nuevamente, con una dilución 1:100 de inmunoglobulina G de cabra contra ratón, conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Cappel, Organon Teknika Corp. Pensilvania, USA). Las láminas se incubaron por 30 minutos a 37°C, se lavaron, dejaron

secar y se observaron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss, con un aumento de 40X.

Los patrones de reactividad de los AcM definen 11 variantes antigénicas, cada una de las cuales es originaria de una especie animal particular, y se muestran en la Tabla 2, (de Mattos y de Mattos, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la caracterización antigénica de las 45 cepas de virus rábico aisladas de cerebros de diferentes especies animales, se muestran en la Tabla 3, se observa que las cepas aisladas de los animales domésticos, correspondieron a la variante antigénica 3 (*Desmodus rotundus*). El caso de rabia en canino del año 2002, correspondió a un animal ubicado en un área urbana del Municipio Linares Alcántara del estado Aragua y se reportó que esta mascota no había sido movilizada de su sitio de origen previo a la aparición de los síntomas y la muerte. El caso de rabia en un gato en el año 2004, correspondió a otra mascota ubicada en un área urbana del Municipio Alberto Adriani del estado Mérida y con las mismas características del caso canino.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen el segundo reporte que se realiza, después de 10 años, para conocer la situación epidemiológica de las variantes antigénicas de la rabia en Venezuela. La primera investigación sobre este particular, fue realizada por Díaz *et al.* (1994), quienes al analizar 23 cepas virales, encontraron la variante antigénica 1 exclusivamente en caninos, la variante 3 en bovinos, equino, oveja y murciélago hematófagos y la variante 5 exclusivamente en bovinos.

En la presente investigación, solo se detectó la variante antigénica 3, tanto en animales domésticos como en mascotas, circulando durante los cuatro años del análisis, lo cual sugiere que los murciélagos hematófagos constituyen la principal especie transmisora del virus rábico para los animales domésticos en la mayoría de los estados del país y se apoya en el hecho de que la variante antigénica 3 está presente en la mayoría de los países de Sudamérica, indicando la importancia de los murciélagos hematófagos como reservorio del virus de la rabia (Favoretto *et al.*, 2002).

Desmodus rotundus constituye la especie transmisora más común del virus de la rabia en zonas rurales y debido a sus hábitos de vida, puede transmitir fácilmente el virus a murciélagos no hematófagos, ya que ambos pueden compartir en algún momento un nicho ecológico particular, lo cual trae como consecuencia que estos últimos se conviertan también en vectores transmisores de la enfermedad (Smith, 1989; de Mattos *et al.*, 2000; MacColl *et al.*, 2000). Sin embargo, el hecho de no haberse aislado virus en los murciélagos analizados durante el período de estudio, pudiera deberse a que las capturas de estos animales no se realizaron al momento de presentarse los casos de la enfermedad o a que no se realizaron en forma continua, ni en zonas cercanas a los casos (Bracamonte, 1997). La gran movilidad de que están dotados los murciélagos, gracias a su capacidad de vuelo, sumada a sus hábitos migratorios, determina que pueda haber pasado un tiempo prolongado

entre la detección de un caso de rabia en un animal doméstico y la migración de la zona del murciélago vector.

La detección de la variante antigénica tipo 3, en dos animales domésticos de zonas urbanas de Aragua y Mérida sin historia de que éstos hayan sido movilizados a otros estados donde podrían haber contraído la enfermedad, indica una transmisión murciélago hematófago-canino y murciélago hematófago-gato. Esto determinó que se estableciera en su momento una alerta epidemiológica inmediata en estas áreas, lo cual conllevó a la implementación de las medidas sanitarias de captura de murciélagos en las zonas cercanas al sitio donde se ubicaron los casos, así como a la captura y eliminación de perros callejeros. Así mismo, es un hallazgo de importancia significativa desde el punto de vista epidemiológico, debido a que los estados Aragua y Mérida, se encontraban libres de rabia urbana desde 1985 y 1991, respectivamente) (Ministerio de Salud y Desarrollo Social, 2004). Por lo general, en Latinoamérica, son los caninos los principales transmisores de la rabia en zonas pobladas, siendo los virus aislados en estos casos, perteneciente a las variantes 1 y/o 2 (Delpietro *et al.*; 1997; Favoretto *et al.*, 2002).

La situación en la cual los murciélagos transmiten el virus a animales domésticos en zonas pobladas, puede deberse a que al expandirse las ciudades a áreas que originalmente estaban deshabitadas, se crean hábitat análogos a las cuevas naturales que éstos necesitan para sobrevivir (túneles, alcantarillas, edificaciones abandonadas), incrementando así el riesgo de contacto de humanos y animales domésticos con los murciélagos y otros animales salvajes. Esto trae como consecuencia la re-emergencia de esta peligrosa enfermedad en zonas que por años se consideraban libres de rabia (Acha y Szyfres, 1989; De Mattos *et al.*, 2000, Yung *et al.*, 2002; Cisterna *et al.*, 2005).

La no detección de la variante 5, hace pensar, por una parte, que la cepa se haya desplazado a otras zonas de la región, como consecuencia directa de la migración constante de las colonias de murciélagos hematófagos. En tal sentido, Favoretto *et al.* (2002), demostraron la presencia de la variante 5 en un gato, un bovino y un zorro en Brasil. Favi *et al.* (2003), encontraron esta misma variante en bovinos de Bolivia, en una encuesta realizada entre los años 1997-2000, lo que indica que sigue circulando, aunque en baja proporción, en Sudamérica. (Yung *et al.*, 2002). Sin embargo, la distribución geográfica de las cepas caracterizadas en el período estudiado, nos hace reconocer a la variante 3 como la de actual circulación en Venezuela.

CONCLUSIONES

Con esta investigación se demuestra la importancia de la caracterización antigénica de virus rábicos para conocer la aparición, mantenimiento y desplazamiento de las variantes antigénicas en el territorio nacional y a la vez permite su comparación con las circulantes en el resto del continente.

De acuerdo a la distribución geográfica de las cepas estudiadas, la variante antigénica 3 (murciélago hematófago) del virus rábico, fue la dominante en los casos de rabia silvestre detectados en el periodo 2001-2004 en Venezuela. Igualmente, esta variante fue aislada en dos zonas urbanas, lo que sugiere que

la especie de murciélago hematófago invadió, en ese momento, áreas que no correspondían a su nicho ecológico natural.

No se descarta la posibilidad de la presencia de otras variantes antigénicas, en cuyo mantenimiento y transmisión estén involucradas diferentes especies de mamíferos salvajes.

REFERENCIAS

1. Acha P.; Szyfres B. 1989. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre a los animales. 2nd ed. *Organización Panamericana de la Salud*. New York. Publicación Científica **N° 503**:502-526.
2. Bracamonte M. 1997. El curioso mundo de los murciélagos. *FONAIAP Divulga*. Año XVI **N° 56**. Abril-Junio. 14-16.
3. Bracamonte M.; Plaza N. 2000. Zoonosis más frecuentes en Venezuela. Enfermedades de los Animales. *FONAIAP-CENIAP*. Ed. Serie D **N° 41**:24-33.
4. Cisterna D.; Bonaventura R.; Caillou S.; Pozo O.; Andreu M.; Fontana L.; Echagoyen C.; de Mattos C.; de Mattos C.; Russo S.; Novaro L.; Elberger D.; Freire M. 2005. Antigenic and molecular characterization of rabies virus in Argentina. *Virus Res.*, **109**:139-147.
5. Delpietro H.; Hurí-Dhomen F.; Larghi O.; Mena-Segura C.; Abramo L. 1997. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. *Zentralbl Veterinarmed B.*, **44**:477-483.
6. De Mattos C.; de Mattos C. 1989. Técnicas Moleculares para Caracterización de Virus Rábico. Pan American Health Organization/World Health Organization Technical consultation on the use of monoclonal antibodies for rabies virus characterization and epidemiological surveillance in Latin America and the Caribbean. 18-19 October, Washington, D.C. *Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office for the World Health Organization*, pp. 4-10.
7. De Mattos C.; de Mattos C.; Ruprecht E. 2001. Rhabdoviruses. In: *Fields Virology*. **Chapter 39**. Lippincott, Williams & Williams Eds. Fourth edition, Philadelphia. pp. 1245-1277.
8. De Mattos C.; Favi M.; Yurig V.; Pavletic C.; de Mattos C. 2000. Bat rabies in urban centres in Chile. *J. Wildl. Dis.*, **36**:231-240.
9. Díaz A.; Papo S.; Rodríguez A.; Smith J. 1994. Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin America and the Caribbean. *J. Vet. Med.*, **41**:153-160.
10. Favi M.; Nina A.; Yung V.; Fernandez J. 2003. Characterization of rabies isolates in Bolivia. *Virus Res.*, **97**:135-140.
11. Favoretto S.; Carrieri M.; Cunha E.; Aguiar E.; Silva L.; Sodre M.; Souza M.; Kotait I. 2002. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, **44**:91-95.

12. Johnson N.; Letshwenyo M.; Baipoledi EK.; Thobokwe G.; Fooks A. 2004. Molecular epidemiology of rabies in Botswana: A comparison between antibody typing and nucleotide sequence phylogeny. *Vet. Microbiol.*, **10**:31-38.
13. McColl K.; Tordo N.; Aguilar Setien A. 2000. Bat lyssavirus infections. *Rev. Sci. Tech.*, **19**:177-196.
14. Meslin FX.; Kaplan M.; Koprowski H. Laboratory Techniques in Rabies. 1996. *World Health Organization Eds.* Geneva, Switzerland. 476 p.
15. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. 2004. Alerta Epidemiológico. Zoonosis: Rabia Urbana. Semana epidemiológica **Nº 52**. Venezuela.
16. Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud. 2001. *Boletín Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas*. **Vol. XXXIII**:23-29.
17. Reid-Saden F.; Summer J.; Smith J.; Fedaku M.; Shaddock J.; Bellini W. 1990. Rabies diagnostic reagents prepared from rabies N-gene recombinant expressed in baculovirus. *J. Clin. Microbiol.*, **28**:858-863.
18. Smith J. 1989. Monoclonal antibodies studies of rabies in insectivorous bats of the United States. *Rev. Infect. Dis.*, **10 (supl: 4)**:2637-2643.
19. Yung V.; Favi M.; Fernandez J. 2002. Genetic and antigenic typing of rabies virus in Chile. Brief report. *Arch. Virol.*, **147**:2197-2205.

Tabla 1. Diagnósticos de Rabia. Venezuela. Periodo 2001-2004

Año	Bovinos		Equinos		Ovinos		Caninos		Gatos		Murciélagos				Otras especies*		Total
											HEMATOFAGOS		NO HEMATOFAGOS				
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
2001	4	36	0	13	0	9	0	270	0	20	0	23	0	5	0	20	400
2002	16	30	0	9	2	1	1	141	0	21	0	20	0	18	0	8	267
2003	5	42	1	13	0	6	0	108	0	5	0	5	0	11	0	7	203
2004	12	43	3	7	0	3	0	121	1	4	0	55	0	210	0	12	471
TOTAL	37	151	4	42	2	19	1	640	1	50	0	103	0	244	0	47	1.341

POS: Positivo. NEG: Negativo. * Cerdo, mono, hámster, ratón, rata, venado, conejo, búfalo cabra, burro, oso.

Fuente: Laboratorio de Rabia. Sanidad Animal – CENIAP – INIA.

Tabla 2. Variantes antigénicas de virus rábico definidas por 8 anticuerpos monoclonales dirigidos contra la nucleocapside viral *

Especie de origen	ANTICUERPOS MONOCLONALES								Variante Antigénica
	C1	C4	C9	C10	C12	C15	C18	C19	
Perro/mangosta	+	+	+	+	+	+	-	+	1
Perro	+	+	-	+	+	+	-	+	2
Vampiro	-	+	+	+	+	-	-	+	3
Tadarida brasiliensis	-	+	+	+	+	-	-	-	4
Vampiro	-	+	V	+	+	V	-	V	5
Lasiurus cinereus	v	+	+	+	+	-	-	-	6
Zorro de Arizona	+	+	+	-	+	+	-	+	7
Zorrillo de Centro/Sur USA	-	+	+	+	+	+	+	+	8
Tadarida br. mexicana	+	+	+	+	+	-	-	-	9
Zorrillo de Sur California USA	+	+	+	+	-	+	-	+	10
Vampiro	-	+	+	+	-	-	-	+	11

* Clasificación de de Mattos y de Mattos (1996). +: Positivos, - : Negativo, V: Variable

Tabla 3. Caracterización Antigénica* de Cepas de Virus Rábico Aisladas de Diferentes Especies Animales. Venezuela. Periodo 2001-2004

Años	Especie donde se aisló	N° de cepas pertenecientes a cada variante antigénica°										
		1 Perro, mangosta	2 Perro	3 Vampiro	4 <i>Tadarida brasiliensis</i>	5 Vampiro	6 <i>Lasirius cinereus</i>	7 Zorro de Arizona	8 Zorrillo centro/sur USA	9 <i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>	10 Zorrillo Sur California	11 Vampiro
2001	Bovino	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bovino	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-
2002	Ovino	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	Canino	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
2003	Bovino	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Equino	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
2004	Bovino	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
	Equino	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gato	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

* Clasificación de de Mattos y de Mattos (1996). ° Se indica la especie de animal reservorio de origen para la cepa viral.

Fuente: Laboratorio de Rabia. Sanidad Animal – CENIAP – INIA.